

## Charakterystyka kolekcji własnej szczepów klinicznych z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów

### Characteristics of own collection of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains, hosts of bacteriophages

Monika Brzychczy-Włoch<sup>1</sup>, Dorota Ochońska<sup>1</sup>, Anna Dobrut<sup>1</sup>, Ewa Olchawa<sup>2</sup>,  
Małgorzata Bulanda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii,  
Wydział Lekarski, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków  
<sup>2</sup>Instytut Biotechnologii, Surowic i Szczepionek BIOMED Spółka Akcyjna, Kraków

---

W opracowaniu przedstawiono charakterystykę kolekcji klinicznych izolatów *P. aeruginosa*, gospodarzy-bakteriofagów, wykorzystanych jako szczepy indykatorowe do badania zakresu litycznego fagów p/*P. aeruginosa*. Bakterie scharakteryzowano pod względem określenia zakresu profilu lekooporności, czynników wirulencji oraz zmienności genetycznej. Zastosowane w zaprezentowanej pracy metody fenotypowe i molekularne wykazały znaczne zróżnicowanie badanych szczepów- gospodarzy, w tym zidentyfikowano 18 profili lekooporności, odnotowano wysoki odsetek szczepów posiadających geny wirulencji, uzyskano 18 unikalnych wzorów restrykcyjnych PFGE.

**Słowa kluczowe:** bakteria-gospodarz, fagotypowanie, PFGE, *Pseudomonas aeruginosa*

---

#### ABSTRACT

**Introduction:** The paper presents the phenotypic and molecular characteristics of the collection of 18 *P. aeruginosa* clinical isolates used as host indicators to study the lytic range of 12 phages against *P. aeruginosa*.

**Methods:** The phages host ranges were assayed by spot tests. Phenotypic characteristics of strains was investigated by the API 20NE biochemical fingerprinting, oxidase tests, the production of pyocyanin, fluorescein and L-arginine dihydrolase. Resistance profiles were analyzed. The PCR method and sequencing were used to study the distribution the genes of alkaline protease (*aprA*), exotoxin A (*exoA*), elastase B (*lasB*), exotoxins (*exoS/T/U/Y*), phenazine modifying genes (*phzM*, *phzS*) and to identify selected  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>). Additionally, the genetic diversity was investigated by PFGE.

**Results:** Twenteen newly isolated *P. aeruginosa* phages were found to lyse 100% of the analyzed strains. Phages PAR\_3 and PAR\_10 exhibited the highest lytic activity against isolates, lysing, 77,8% strains tested. The other phages, PAR\_9 and PAR\_12, presented generally weaker activity against bacteria, lysing respectively, 50% and 44,4% of tested strains. *AprA*, *exoA*, *phzM*, *phzS* were presented in all strains; *lasB* in 77,8%. The most frequently combination of egzoenzyme genes S<sup>+</sup>/T<sup>+</sup>/U<sup>+</sup>/Y<sup>+</sup> in 78% isolates was remarked. In collection, 18 different resistance profiles were observed and 44% isolates were classified as MDR. The *bla*<sub>GES</sub> was the most prevalent gene (44%), followed by *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> detected in 17% and 11,1% isolates, respectively. *Bla*<sub>OXA-2</sub> was detected in only 5,5% of all isolates. In PFGE method, 18 singletons (A-S) were identified. No relationship between resistance, virulence and PFGE groups was found.

**Conclusion:** In summarize, all phages infect multiple host species and showed a broad lytic spectrum. All bacteria tested were infected by multiple phages and displayed a wide range of susceptibility. In general, we observed a high degree of genetic diversity and individuality of the studied *P. aeruginosa* collection, bacteriophage hosts.

**Key words:** host bacterium, phage typing, PFGE, *Pseudomonas aeruginosa*

---

## WSTĘP

*Pseudomonas aeruginosa* pozostaje jednym z najważniejszych czynników chorobotwórczych człowieka wywołując szereg poważnych zakażeń szczególnie u pacjentów z osłabioną odpornością np. po oparzeniach, po przeszczepach, u pacjentów z mukowiscydozą czy u pacjentów onkologicznych (3). Zakażenia wywoływane przez ten oportunistyczny patogen są niezwykle trudne do zwalczania w związku z licznymi mechanizmami oporności naturalnej i nabytej w drodze mutacji chromosomalnych lub horyzontalnego transferu genów (ang. *Horizontal Gene Transfer*, HGT) (10). Dodatkowo, gatunek ten może rozwijać szereg innych mechanizmów oporności jak enzymatyczna inaktywacja leku, zmniejszenie przepuszczalności osłon czy nadekspresja aktywności pomp typu *efflux*. Nagromadzenie kilku różnych determinant oporności prowadzi do selekcji szczepów typu MDR (ang. *Multi-Drug Resistant*), XDR (ang. *Extensively-Drug-Resistant*) oraz PDR (ang. *Pan-Drug-Resistant*) (15).

Duży genom *P. aeruginosa* składa się z genomu podstawowego (ang. *Core Genome*) i genomu dodatkowego (ang. *Accessory Genome*). Analizy genomów wykazały, że fundamentalne znaczenie dla zdolności adaptacji do różnych środowisk oraz zróżnicowania w obrębie gatunku *P. aeruginosa* ma genom dodatkowy (11). Strukturę populacji *P. aeruginosa* w dużej mierze determinuje informacja genetyczna zawarta w genomie dodatkowym w skład którego mogą wchodzić integrony, transpozony, plazmidy, sekwencje ICE (ang. *Integrative and Conjugative Elements*), sekwencje insercyjne oraz profagi. Bakteriofag  $\phi$ CTX podnosi zjadliwość *P. aeruginosa*, dzięki genowi *ctx* kodującemu toksynę typu PFT (ang. *Pore-Forming Toxin*) zdolną do przerywania ciągłości błony komórkowej atakowanej komórki bakteryjnej. Z kolei infekcja szczepu bakteriofagiem D3 prowadzi do modyfikacji w strukturze LPS i może przyczyniać się do efektywniejszej adhezji bakterii

do powierzchni komórek gospodarza (serokonwersja). Natomiast infekcja bakteriofagiem FIZ15, powoduje większą odporność bakterii na fagocytozę (11). Wszystkie wymienione elementy genetyczne zlokalizowane są w regionach plastyczności genomu RGP (ang. *Region of Genome Plasticity*) będącymi punktami insercji wysp genomowych lub profagów (10). DNA profagów włączone w genom gospodarza może podnosić stopień zjadliwości drobnoustroju, jak również wpływać na modyfikację struktury lipopolisacharydu (LPS) oraz warunkować większą odporność patogenu na fagocytozę, liczne antybiotyki i metale ciężkie (11). Czynniki wirulencji *P. aeruginosa* kodowane przez genom w obrębie wysp patogenności PAGI (ang. *P. aeruginosa Genomic Island*) lub wysp genomowych, mogą być wydzielane pozakomórkowo w tym: egzotoksyna A (gen *exoA*) której działanie polega na miejscowym uszkodzaniu tkanek oraz hamowaniu syntezy komórek gospodarza; egzoenzymy (S,T,U,Y) (geny *exo S,T,U,Y*) odpowiadające za spowolnienie procesu fagocytozy, wywoływanie efektu cytopatycznego względem komórek nabłonkowych i makrofagów oraz uczestniczące w reorganizacji cytoszkieletu komórki eukariotycznej; fosfolipaza C (PLC) hemolizyna niszcząca surfaktant płucny może przyczyniać się do rozwoju niedodmy płucnej, dodatkowo pośredniczy w szlakach przekazywania sygnałów związanych z procesami regulującymi metabolizm komórki, jej wzrost i różnicowanie, a także w indukowaniu apoptotycznej śmierci komórki; elastaza rozkładająca białka strukturalne, biorąca udział w degradacji połączeń między komórkami nabłonkowymi oraz inaktywująca ludzki inhibitor proteinaz  $\alpha$ -1 oraz immunoglobuliny IgG, IgA; alkaliczna proteaza (gen *aprA*) i elastazy (geny *lasA*, *lasB*) uszkodzające komórki i tkanki organizmu gospodarza; plocjanina (*phzM*, *phzS*), fluoresceina, inne barwniki, enzymy, toksyny lub związane z komórką, tj. LPS, rzęski, pile. Wydzielanie to odbywa się za pośrednictwem czterech głównych systemów sekrecji (ang. *Type ... Secretion System*), T1SS (alkaliczna proteaza), T2SS (egzotoksyna A, elastaza B), T3SS (egzoenzymy (S,T,U,Y) oraz T6SS (1). Regulacja wytwarzania czynników wirulencji zależna jest od mechanizmu QS (ang. *Quorum Sensing*) kontrolującego ekspresję wielu genów i odbywa się przy udziale środowiskowych autoinduktorów typu AHL i AQ. Dzięki tym mechanizmom komórka bakteryjna jest w stanie kontrolować liczebność populacji, jak również dostosowywać się do zmieniających się warunków poprzez ekspresję konkretnych genów (11).

Ze względu na wyżej wymienione czynniki wciąż rosnąca liczba wielolekoopornych izolatów *P. aeruginosa* zmusza do poszukiwania nowych narzędzi terapeutycznych, np. preparatów bakteriofagowych jako alternatywy dla antybiotyków.

Celem niniejszej pracy była szczegółowa charakterystyka własnej kolekcji szczepów klinicznych z gatunku *P. aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów, wykorzystanych jako szczepy homologiczne do izolacji specyficznych bakteriofagów terapeutycznych.

## MATERIAŁ I METODY

**Szczepy bakteryjne.** Badaniami objęto 18 izolatów *P. aeruginosa* pochodzących z kolekcji szczepów gospodarzy bakteriofagów Instytutu Biotechnologii Surowic i Szczepionek BIOMED Spółka Akcyjna w Krakowie. Izolaty *P. aeruginosa* pochodziły z różnych materiałów klinicznych, w tym wymazów z ucha (3 izolaty), ran (11 izolatów) oraz od pacjentów z mukowiscydą (4 izolaty) (Tabela I). Hodowle bakteryjne prowadzone były na podłożu Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej (BLA, bioMérieux), agarze MacConkey'a (Biocorp),

agarze Kinga B (Biocorp), podłożu TSB (Biocorp), płynnym podłożu BHI (Oxoid), płynnym podłożu Philipsa w temp. 37°C. Identyfikacji gatunkowej dokonano w oparciu o klasyczne metody fenotypowe (morfologia kolonii, wytwarzanie pliczanki i fluoresceiny, wytwarzanie L-dwuhydrolazy argininy oraz test na oksydazę cytochromową (BBL™DrySlide™, Becton Dickinson) włączając metody biochemiczne z użyciem testu ID 32 GN oraz systemu miniAPI (bioMérieux). Do przechowywania kultur bakteryjnych w -70°C celu przeprowadzenia dalszych analiz wykorzystano system Microbank®Mix (Biocorp).

**Test ang. host range.** Określenie zakresu aktywności litycznej 12 fagów przeprowadzono z użyciem 18 izolatów klinicznych *P. aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów (Tabela II). Fagotypowanie prowadzono w RTD (ang. *Routine Test Dilution*) i 100xRTD wykonując ang. *spot test* wg metody Postic i inni (21), zmodyfikowanej. Odczytu i interpretacji wyników dokonywano zgodnie z kryteriami przez określenie ilości lysinek PFU (ang. *Plaque Forming Unit*) w miejscu naniesienia faga. W celu sprawdzenia poprawności wykonania testu i wykluczenia reakcji fałszywie dodatnich, dla każdego szczepu wykonano kontrole ujemne. Test ang. *host range* wykonano dla każdego z badanych fagów co najmniej dwukrotnie z każdym z testowanych szczepów, badanie prowadzono w niezależnych eksperymentach.

**Oznaczanie lekooporności.** Badanie lekooporności na antybiotyki badanych szczepów *P. aeruginosa* przeprowadzono zgodnie z rekomendacjami EUCAST (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), <http://www.eucast.org/> (8). Jako szczep referencyjny użyto *P. aeruginosa* ATCC 27853. Kwalifikacji szczepów do kategorii MDR, XDR, PAN dokonano w oparciu o definicje według Magiorakos i inni (15).

**Metody fenotypowe wykrywania β-laktamaz typu ESβL, MBL, KPC.** Do wykrywania karbapenemaz typu ESβL (ang. *Extended-Spectrum β-Lactamases*) wykorzystano wstępny test dwóch krążków DDST (ang. *Double Disk Synergy Test*) w oparciu o kryteria Giske i inni (9). U izolatów niewrażliwych (średniowrażliwych lub opornych) na karbapenemy (imipenem, meropenem, doripenem) wykonano wstępne testy fenotypowe na obecność karbapenemaz typu MBL (ang. *Metallo-β-Lactamases*) (13) oraz typu KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (7). Jako szczep referencyjny użyto *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Izolacja DNA, amplifikacja i detekcja.** Izolację DNA bakteryjnego przeprowadzono za pomocą zestawu Genomic Mini Purification Kit (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją producenta. Wszystkie badane próbki amplifikowano przy użyciu termocyklera Thermal Cycler T100™ (Bio-Rad). Rozdziału produktów amplifikacji dokonano w 1,5% żelu agarozowym (PRONA).

**Detekcja genów kodujących wybrane β-laktamazy.** Detekcję genów kodujących wybrane β-laktamazy włączając *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> przeprowadzono za pomocą reakcji PCR zgodnie z dostępną metodą (2,5,5,20,24,23). Wątpliwe produkty PCR poddano sekwencjonowaniu (Genomed). Analizy sekwencji dokonano z użyciem programu BLAST dostępnego na stronie internetowej NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

**Detekcja genów kodujących wybrane czynniki wirulencji.** Obecność genów kodujących wybrane czynniki wirulencji: *alkaliczną proteazę* (gen *aprA*); elastazę B (gen *lasB*); egzotoksyny (geny: *exoA*, *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*); pliczankinę (geny: *phzM*, *phzS*) potwierdzano na podstawie przeprowadzonych reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów (1,4,177).

**Analiza profili restrykcyjnych.** Analizę zmienności genetycznej badanych szczepów przeprowadzono za pomocą elektroforezy pulsacyjnej w zmiennym polu elektrycznym PFGE (ang. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) po uprzednim trawieniu genomu bakteryjnego enzymem restrykcyjnym *SpeI* (Fermentas). Elektroforezę prowadzono w 1% żelu agarozowym (Bio-Rad) przy użyciu zestawu CHEF DR® II (Bio-Rad) zgodnie z dostępnym protokołem (16). Fragmenty DNA w żelu wybarwiono bromkiem etydyny i oglądano w świetle UV przy użyciu systemu Gel Doc 2000 (Bio-Rad). Oprogramowania Gel Compar II®, BioNumerics wersja 6.5 (Applied Maths) użyto do konstrukcji dendrogramu (współczynnik Dice, UPGMA, optymalizacja 0,5%, tolerancja 1%).

## WYNIKI

**Określenie właściwości biochemicznych.** Analiza właściwości biochemicznych wykazała, że wszystkie izolaty posiadały zdolność do wytwarzania oksydazy cytochromowej i L-dwuhydrolazy argininy - zarówno w warunkach tlenowych i beztlenowych, 56% izolatów syntetyzowało fluoresceinę, a 16,7% posiadało zdolność do produkcji plicjaniny.

**Zakres aktywności litycznej.** W teście ang. *host range* wykorzystano fagi o różnym spektrum aktywności litycznej (Tabela II). Bakteriofagi PAR\_3; PAR\_10 wykazywały najwyższą aktywność lityczną wobec izolatów *P. aeruginosa*, lizując 77,8% testowanych szczepów. Inne fagi, PAR\_9 i PAR\_8, wykazywały ogólnie słabszą aktywność przeciwko bakteriom, lizując odpowiednio 50% i 44,4% badanych izolatów. Pozostałe bakteriofagi wykazały wysoką siłę lityczną (55,5%-72,2%). W badanej puli szczepów-gospodarzy 22,2% wykazało wrażliwość na cały panel zastosowanych bakteriofagów, 1 szczep (5,5%) cechował najniższy stopień wrażliwości na testowane fagi.

**Profile lekooporności.** Wśród badanych izolatów *P. aeruginosa* zidentyfikowano 18 profili lekooporności. 16,7% opornych na ceftazydym i cefepim oraz 5,5% opornych na aztreonam oraz piperacylinę z tazobaktamem. Oporność na doripenem była niższa (16,7%) w stosunku do oporności na imipenem i meropenem, którą wykazało 22,2% szczepów. Wśród aminoglikozydów obserwowano najmniejszy odsetek szczepów opornych na amikacynę (16,7%) w porównaniu do odsetka szczepów opornych na gentamycynę, netilmycynę oraz tobramycynę (38,9%, 27,8% oraz 27,8%). Wśród fluorochinolonów, 44,4% izolatów było opornych na ciprofloksacynę oraz lewofloksacynę. Wszystkie badane izolaty wykazywały całkowitą oporność na tikarcylinę z kwasem klawulanowym. Nie stwierdzono izolatów opornych na kolistynę. Żaden z badanych szczepów nie wykazywał obecności  $\beta$ -laktamaz ESBL, MBL, KPC we wstępnych metodach fenotypowych. Zgodnie z *Magiorakos* i inni, 8 izolatów (44,4%) zostało zakwalifikowanych jako fenotyp MDR (15). W badanej kolekcji nie stwierdzono obecności szczepów o fenotypach XDR oraz PDR (Tabela III).

Tabela I. Charakterystyka izolatów klinicznych *P. aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów.

Lp.	Symbol szczepu	Pochodzenie szczepu	Data izolacji szczepu	Miejsce pobrania materiału/ materiał badany	Rozpoznanie kliniczne
1.	P2920	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	22.09.2012 r.	rana/ wymaz	stan po operacji - kikut lewej kończyny dolnej
2.	P3448	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	14.12.2012 r.	rana/ wymaz	przetoka okolicy kolana lewego - stan po urazie
3.	16541	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepioneń im. Dr J. Bobra	25.06.2012 r.	ucho lewe/ wymaz	zapalenie ucha
4.	17478	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepioneń im. Dr J. Bobra	04.07.2012 r.	rana/ wymaz	rana powypadkowa, noga prawa
5.	22726	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepioneń im. Dr J. Bobra	17.09.2012 r.	rana podudzia prawego/ wymaz	stan po zmiążdżeniu podudzia i otwartym złamaniu
6.	18168	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepioneń im. Dr J. Bobra	12.07.2012 r.	ucho prawe i lewe/ wymaz	zapalenie ucha
7.	367/2013	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej „ZDROJE”	10.01.2013 r.	plwocina	mukowiscydoza
8.	12584	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepioneń im. Dr J. Bobra	20.06.2012 r.	ucho prawe/ wymaz	zapalenie ucha
9.	15412/2012	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej „ZDROJE”	24.11.2012 r.	plwocina	mukowiscydoza
10	15835/2012	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej „ZDROJE”	30.11.2012 r.	plwocina	mukowiscydoza
11.	P2145	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	08.08.2012 r.	rana/ wymaz	owrzodzenie odleżynowe okolicy krzyżowej
12.	P2171	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	10.08.2012 r.	rana/ wymaz śródoperacyjny	endoproteza, rewizyjna stawu biodrowego lewego
13.	12	PROLAB Sp. z o. o. sp. komandytowa	17.05.2011 r.	owrzodzenie/ wymaz	owrzodzenie odleżynowe
14.	30/IG	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej „ZDROJE”	28.11.2012 r.	plwocina	mukowiscydoza
15.	P1799	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	03.07.2012 r.	rana/ wymaz	rak jelita grubego
16.	P2115	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	04.08.2012 r.	rana podudzia-powierzchnia przednia/ wymaz	rozeście rany pooperacyjnej
17.	P1815	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	04.07.2012 r.	rana/ wymaz	stan po laparotomii
18.	P2117	Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie	04.08.2012 r.	rana/ wymaz	otwarte złamanie podudzia

Tabela II. Wyniki testu ang. *host range* z klinicznymi izolatami *P. aeruginosa*, gospodarzami bakteriofagów.

Lp.	Symbol szczepu	Nr faga											
		PAR_1	PAR_2	PAR_3	PAR_4	PAR_5	PAR_6	PAR_7	PAR_8	PAR_9	PAR_10	PAR_11	PAR_12
1.	P2920	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	+++
2.	P3448	-	-	++	++	+	-	-	-	-	++	-	-
3.	16541	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	++	-	-
4.	17478	-	-	++	-	-	-	+++	+++	-	-	++	-
5.	22726	++	++	++	++	++	+	++	+++	+++	+++	++	+++
6.	18168	++	++	++	++	++	++	-	+++	-	+++	+	+++
7.	367/2013	+	++	-	-	+	-	++	++	-	-	-	-
8.	12584	++	++	++	++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
9.	15412/2012	-	++	-	-	+	-	++	++	-	-	+	-
10	15835/2012	++	-	-	-	-	-	+++	++	-	+	-	++
11.	P2145	++	+++	+++	+++	++	+++	++	-	-	-	++	+++
12.	P2171	-	-	++	-	-	-	++	+++	-	+++	-	-
13.	12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
14.	30/IG	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	-	-
15.	P1799	+	+++	+	+	+	+	+	+++	+++	+	+	-
16.	P2115	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	++	++	++	-
17.	P1815	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
18.	P2117	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	-

Legenda: +++ szczepy mocno lizujące (> 30 tysinek fagowych); ++ szczepy słabo lizujące (20-30 tysinek fagowych); + szczep bardzo słabo lizujący (pojedyncze tysinki fagowe, <20); - szczepy nie lizujące (brak tysinek fagowych) wg *Postic* i inni [21].



Tabela III. Wybrane antybiotyki wraz z odsetkiem izolatów *P. aeruginosa* opornych, wg Magiorakos i inni [15].

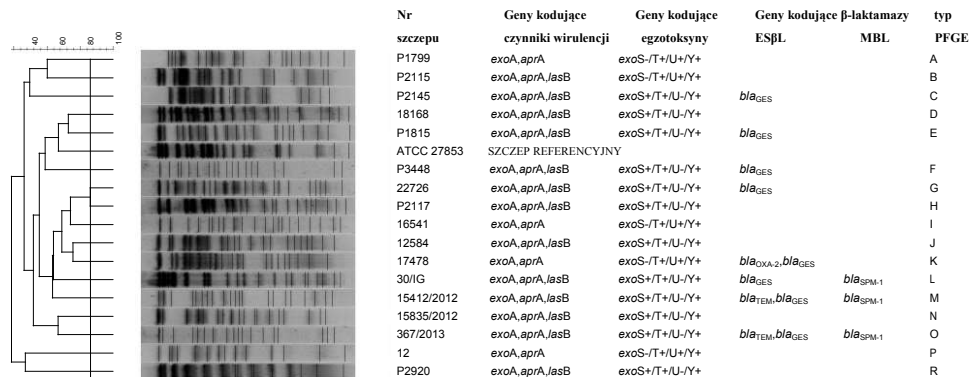
Antybiotyk	Liczba / odsetek izolatów opornych	
	n	%
<b>Aminoglikozydy:</b>		
Amikacyna	7	38,9
Gentamycyna	5	27,8
Netilmycyna	3	16,7
Tobramycyna	6	27,8
<b>Karbapenemy:</b>		
Imipenem	4	22,2
Doripenem	3	16,7
Meropenem	4	22,2
<b>Cefalosporyny:</b>		
Cefepim	3	16,7
Ceftazydym	3	16,7
<b>Fluorochinolony:</b>		
Ciprofloksacyna	8	44,4
Levofloksacyna	8	44,4
<b>Penicyliny + inhibitory <math>\beta</math>-laktamaz:</b>		
Piperacylina+tazobaktam	1	5,6
Tikarcylina+kwas klawulanowy	18	100
<b>Monobaktamy:</b>		
Aztreonam	1	5,6
Kolistyna	0	0
Polimyksyny	0	0

**Geny kodujące  $\beta$ -laktamazy.** W badanej grupie szczepów osiem izolatów (44,4%) posiadało gen  $bla_{GES}$ , natomiast gen  $bla_{TEM}$  wykryto u 2 izolatów (11,1%) (Ryc. 2). Obecność genu  $bla_{OXA-2}$  potwierdzono u 1 izolatu (5,5%). Współwystępowanie genów  $bla_{GES}$  i  $bla_{TEM}$  odnotowano u 2 izolatów (11,1%), natomiast  $bla_{GES}$  i  $bla_{OXA-2}$  u 1 izolatu (5,5%). Nie wykryto genów  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{OXA-10}$ ,  $bla_{PER}$ ,  $bla_{SHV}$ . Gen  $bla_{SPM-1}$  oznaczono u 3 izolatów (16,7%) całkowicie opornych na karbapenemy. Nie wykazano szczepów z genami  $bla_{IMP}$ ,  $bla_{VIM}$ . Współwystępowanie genów  $bla_{SPM-1}$  oraz  $bla_{GES}$  potwierdzono u 3 izolatów (16,7%) z kolei  $bla_{SPM-1}$  i  $bla_{TEM}$  u 1 izolatu (5,5%). Dwa szczepy (11,1%) posiadały równocześnie geny  $bla_{GES}$ ,  $bla_{SPM-1}$ ,  $bla_{TEM}$ .

**Geny kodujące wybrane czynniki wirulencji.** Występowanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji u poszczególnych izolatów przedstawiono na Ryc. 1. Wszystkie badane szczepy posiadały gen  $aprA$ ,  $phzM$ ,  $phzS$ , 14 izolatów (77,8%) posiadało dodatkowo gen  $lasB$ . Obecność genu  $exoA$  kodującego egzotoksynę A oraz genu  $exoT$  kodującego egzoenzym T potwierdzono u wszystkich analizowanych szczepów, gen  $exoY$  był obecny u 17 izolatów (94,4%), gen  $exoS$  u 15 izolatów (83,3%), zaś gen  $exoU$  u 4 izolatów (22,2%). Wśród genów kodujących egzotoksyny (S,T,U,Y) najczęściej zaobserwowanym układem było występowanie genów  $exoS^+/T^+/U^+/Y^+$  (77,8%, 14 izolatów),  $exoS^+/T^+/U^+/Y^+$  (11,1%, 2 izolaty),  $exoS^+/T^+/U^+/Y^+$  (5,5%, 1 izolat) oraz  $exoS^+/T^+/U^+/Y^-$  (5,5%, 1 izolat).



**Analiza profili restrykcyjnych.** Wykazano duże zróżnicowanie klonalne badanej kolekcji szczepów *P. aeruginosa*. Stosując metodę PFGE dla 18 badanych izolatów uzyskano 18 unikalnych wzorów genetycznych (pulsotypów) oznaczonych kolejno literami (A-S) (Ryc. 1). Zgodnie z przyjętymi kryteriami (pkt. odcięcia 80% podobieństwa) wszystkie szczepy zostały zidentyfikowane jako odmienne genetycznie. Przeprowadzona analiza nie wykazała związku pomiędzy uzyskanymi pulsotypami PFGE a profilami lekooporności, kombinacją genów kodujących egzotoksyny czy występowaniem genów kodujących  $\beta$ -laktamazy.



Ryc. 1. Analiza makrorestrykcyjna chromosomalnego DNA izolatów *P. aeruginosa*, bakterii-gospodarzy bakteriofagów, po trawieniu enzymem restrykcyjnym *SpeI*, wykreślona z użyciem programu Gel Compar® II (Applied Maths).

## DYSKUSJA

Materiał genetyczny niesiony przez bakteriofagi stanowi ważny dla *P. aeruginosa* depozyt informacji genetycznej. Międzykomórkowy transfer informacji genetycznej za pośrednictwem bakteriofagów na drodze transdukcji umożliwia *P. aeruginosa* wzbogacenie puli genów o dodatkową informację genetyczną pochodzącą często od niespokrewnionych taksonomicznie gatunków bakterii. Dlatego tak ważne jest tworzenie i stałe wzbogacanie kolekcji w nowe posiadające pożądane cechy, dobrze zdefiniowane szczepy co pozwoli na skuteczne monitorowanie zmian w populacjach mikroorganizmów.

Głównym wymaganie stawianym bakteriofagom do terapii jest potwierdzenie ich natury litycznej (wirulentnej). Z punktu widzenia selekcji fagów o potencjale terapeutycznym w warunkach *in vitro* ważne jest określenie zakresu aktywności litycznej czyli zdolności do lizowania izolatów klinicznych, za dobre uznaje się wyniki rzędu 15-30% zlizowanych szczepów. Procent szczepów zlizowanych przez danego faga zależy w dużej mierze od kolekcji bakterii, gospodarzy fagów. Użyte w przeprowadzonej analizie izolaty kliniczne *P. aeruginosa* cechowały się różnym stopniem wrażliwości na badane fagi ale gwarantowały ich szerokie spektrum lityczne (44,4%-77,8%). Podobne działania nad określeniem zakresu litycznego fagów p/*P. aeruginosa* zostały przeprowadzone przez inny zespół badawczy (12). W zaprezentowanej pracy wykazano duże zróżnicowanie pod względem lekooporności badanej kolekcji szczepów *P. aeruginosa*. Nie odnotowa-

no szczepów opornych na kolistynę, co jest zgodne z danymi literaturowymi z Brazylii, Francji i Kanady potwierdzającymi 100% wrażliwość pałeczek *P. aeruginosa* na kolistynę (20,22,25). W naszych badaniach wszystkie szczepy były odporne na tikarcylinę z kwasem klawulanowym, z kolei oporność na piperacylinę z tazobaktamem wykazał zaledwie 1 szczep (5,5%). Możliwe wytłumaczenie podają *Lister* i inni, analizując wpływ kwasu klawulanowego na obniżenie aktywności przeciwbakteryjnej tikarcyliny (14). W badaniu 44,4% izolatów zaklasyfikowano jako MDR. Podobny odsetek (54,5%) szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie MDR przedstawili w swoich pracach *Peña* i inni, podkreślając, że szczepy te stanowią powszechny problem kliniczny (18). Wśród analizowanych szczepów 11,1% posiadało gen *bla*<sub>TEM</sub>, nie stwierdzono natomiast żadnego szczepu posiadającego gen *bla*<sub>SHV</sub>. Otrzymane wyniki są porównywalne z wynikami z Francji czy Szwajcarii, w których autorzy potwierdzają niezwykle rzadkie występowanie β-laktamaz typu TEM i SHV u *P. aeruginosa*, 24). Obecność genu *bla*<sub>OXA-2</sub> kodującego OXA, inną β-laktamazą ESBL potwierdzono u 1 izolatu opornego na piperacylinę. Według *Bert* i inni, klasyczne enzymy OXA w pewnym stopniu hydrolizują ureidopenicyliny (piperacylina) nadając tym samym szczepom oporność na te leki (5). W przedstawionej pracy odnotowaliśmy również 8 (44,4%) izolatów posiadających gen *bla*<sub>GES</sub>. Wyniki te potwierdzają dane literaturowe wskazujące, że β-laktamazy typu GES u *P. aeruginosa* są coraz częściej wykrywane w licznych państwach europejskich (22,24,25).

Głównymi mechanizmami oporności na karbapenemy szczepów z badanej kolekcji było wytwarzanie β-laktamaz typu MBL, co potwierdzono wykryciem genów je kodujących. Nie wykryto genów *bla*<sub>VIM</sub> i *bla*<sub>IMP</sub> choć ich występowanie obserwuje się na całym świecie co zostało opisane w dostępnej literaturze naukowej (22). U trzech izolatów (16,7%) wykazano obecność genu *bla*<sub>SPM-1</sub>. Po raz pierwszy szczep *P. aeruginosa* produkujący β-laktamazę typu SPM-1 opisano w Brazylii w 1997 roku (23), aktualnie szczepy te są coraz bardziej rozpowszechnione także w Europie (22). Prezentowane badania sugerują bliskie pokrewieństwo genetyczne pomiędzy izolatami *bla*<sub>SPM-1</sub>(+) co podkreślają także wcześniejsze doświadczenia (20), natomiast zbyt mała liczba badanych szczepów w kolekcji nie pozwala na jednoznaczne potwierdzenie tej obserwacji.

Egzotoksyny (S,T,U,Y) to białka efektorowe systemu III sekrecji (T3SS) ułatwiające rozwój i progresję zakażenia bakteryjnego. *Peña* C i inni wykazali, że izolaty kliniczne *P. aeruginosa* rzadziej uwalniają egzotoksyny pojedynczo sugerując, że częściej są one uwalniane w specyficznych połączeniach (17). W naszym badaniu zdecydowana większość szczepów (98%) uwalnia egzotoksynę T oraz egzotoksynę Y (95%). W cytowanej publikacji szczególną uwagę zwrócono na izolaty posiadające równocześnie geny kodujące *exoU/S*, gdzie *exoU*<sup>+</sup>/*S*<sup>+</sup> (75%), *exoU*<sup>+</sup>/*S*<sup>-</sup> (21%), *exoU*<sup>-</sup>/*S*<sup>+</sup> (21%) *exoU*<sup>+</sup>/*S*<sup>+</sup> (0,5%). W przedstawionej pracy trzynaście izolatów (78%) prezentowało genotyp *exoU*<sup>+</sup>/*S*<sup>+</sup>, z kolei genotyp *exoU*<sup>+</sup>/*S*<sup>-</sup> potwierdzono u 28% badanych szczepów. Uzyskane wyniki pokrywają się z danymi opublikowanymi przez brytyjskie i hiszpańskie grupy badawcze, gdzie częstość wykrywania genu *exoS*<sup>+</sup> wahała się w granicach pomiędzy 69%-75%, natomiast gen *exoU*<sup>+</sup> wykrywano u 21%-25,4% szczepów *P. aeruginosa* (17). Analizując wyniki przeprowadzonych badań nie znaleziono zależności pomiędzy występowaniem genu *exoU*<sup>+</sup> a opornością na cefalosporyny, karbapenemy i fluorochinolony, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (17).

Badania wykazały dużą zmienność genetyczną w obrębie badanej grupy szczepów,

potwierdzając nieklonalną strukturę globalnej populacji *P. aeruginosa*, zagadnienie to jest szeroko dyskutowane przez inne zespoły badawcze (3,19). Nie znaleziono żadnej zależności pomiędzy profilami lekooporności, występowaniem genów kodujących wybrane czynniki zjadliwości a pulsotypami oznaczonymi przy zastosowaniu metody PFGE.

Podsumowując, celem pracy było przeprowadzenie charakterystyki szczepów z gatunku *P. aeruginosa*, gospodarzy bakteriofagów z zastosowaniem metod fenotypowych i molekularnych. Zaprezentowane izolaty kliniczne *P. aeruginosa* tworzą kolekcję mikrobiologiczną szczepów licencjonowanych i stanowią pulę macierzystą (ang. *Master Seed Lot*) do namnażania bakteriofagów o wysokim potencjale technologicznym oraz terapeutycznym do zwalczania zakażeń o etiologii *P. aeruginosa*, w tym szczepów wielolekoopornych.

**Prezentowana praca była realizowana w ramach projektu o akronimie ONKOFAG pt. „Rozwój fagoterapii w leczeniu antybiotykoopornych zakażeń, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów onkologicznych” (umowa nr INNOMED/I/4/NCBR/2014) i finansowana ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.**

**Podziękowania za współpracę dla Zespołu BIOMED S.A. w Krakowie, w szczególności dla mgr Marty Borodawko i mgr Agnieszki Serwinowskiej. Szczególne podziękowania dla mgr Anny Małskiej-Woźniak z Katedry Mikrobiologii UJ CM za pomoc przy metodzie PFGE.**

#### PIŚMIENNICTWO

1. Ajayi T, Allmond LR, Sawa T i inni. Single-Nucleotide-Polymorphism Mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion Toxins for Development of a Diagnostic Multiplex PCR System. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3526–31.
2. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN i inni. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2670–1.
3. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *Int J Biol* 2015; 7: 44–67.
4. Andrejko M, Zdybicka-Barabas A, Janczarek M i inni. Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Acta Biochim Pol* 2013; 60: 83–90.
5. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA  $\beta$ -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrobial Chemother* 2002; 50: 11–8.
6. Bush K, George A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *AAC* 2010; 969–976.
7. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM i inni. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type  $\beta$ -lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4083–6.
8. EUCAST v. 4.0 2014. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 40, 2014. 2014; 0–79.

9. Giske CG, Martinez L, Cantòn R i inni. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and / or epidemiological importance. Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 2013; (December): 1–40.
10. Klockgether J, Wu D, Wiehlmann L. Transcript profiling of the *Pseudomonas aeruginosa* genomic islands PAGI-2 and pKLC102. Microbiology 2008; 154: 1599–604.
11. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev 2010; 74: 621–41.
12. Kwiatek M, Mizak L, Parasion S i inni. Characterization of five newly isolated bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. Folia Microbiol 2014; 60: 7–14.
13. Lee K, Lim YS, Yong D i inni. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41: 4623–9.
14. Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. Antimicrobial Agents Chemother 1999; 43: 882–9.
15. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB i inni. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection. Eur Soc of Clin Infect Dis; 2012; 18: 268–81.
16. Mar Blanco M, Gibello A, Vela AI i inni. PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. Dis Aquat Organ 2002; 50: 19–27.
17. Nowroozi J, Akhavan Sepahi A, Rashnonejad A. Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of pyocyanine's antimicrobial effects with or without colloidal silver nanoparticles. Cell Journal 2012; 14: 7–18.
18. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S i inni. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Infect Dis 2015; 60: 539–48.
19. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B i inni. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. PLoS ONE. 2009; 4: e7740.
20. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG i inni. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla* CTX-M-2, *bla* GES-1 and *bla* GES-5, *bla* IMP-1 and *bla* SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. BMC Inf D Dis 2012; 12: 176.
21. Postic B, Finland M. 1961 Observations on bacteriophage typing of *Pseudomonas aeruginosa*. JCI 1961; 40: 2064-75.
22. Potron A, Poiriel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. Int J Antimicrobial Agents Elsevier B.V.; 2015; 45: 568–85.
23. Salabi A El, Toleman M a, Weeks J i inni. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. Antimicrobial Agents Chemother 2010; 54: 582.

24. *Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P.* Ambler Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact MINIREVIEW Ambler Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003; 47: 2385–92.
25. *Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B i inni.* Phenotypic Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* Population in a Cystic Fibrosis Patient. *PLoS ONE*. 2013; 8: 1-10.

Otrzymano: 1 II 2018 r.

Adres Autora: 31-121 Kraków, ul. Czysa 18, Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej  
Katedra Mikrobiologii Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego